

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Új információk a XIII-as véralvadási faktor
struktúrájával, hiányával és végstádiumú vese
betegekben bekövetkezett változásaival
kapcsolatban**

Hurják Boglárka

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László akadémikus



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2023

**ÚJ INFORMÁCIÓK A XIII-AS VÉRALVADÁSI FAKTOR
STRUKTÚRÁJÁVAL, HIÁNYÁVAL ÉS VÉGSTÁDIUMÚ VESE
BETEGEK BEN BEKÖVETKEZETT VÁLTOZÁSAIVAL KAPCSOLATBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Hurják Boglárka**, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán Doktori Iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pfliegler György, PhD
Prof. Dr. Nagy Előd, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:	Prof. Dr. Soltész Pál, MTA doktora
tagok:	Prof. Dr. Harangi Mariann, MTA doktora
	Dr. Vezendi Klára, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2023. november 20. (hétfő) 13:00 óra

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. A XIII-as véralvadási faktor szerkezete és funkciója

A XIII-as véralvadási faktor (FXIII) egy transzglutamináz proenzim, amely a fibrin alvadék stabilizálásával és a fibrinolitikus degradációval szembeni védelmével elengedhetetlen a normál hemosztázis fenntartásához. Az FXIII a vérben heterotetramer (FXIII-A₂B₂) formában kering, mely két potenciálisan aktív FXIII-A és két gátló/védő FXIII-B alegységből áll.

A plazmában az FXIII-B alegység többletben van az FXIII-A-hoz képest; az FXIII-B₂ körülbelül 50%-a szabad, nem komplex formában kering. Az FXIII-A-t a trombin általi hasítása és a két alegység Ca^{2+} által indukált disszociációja aktív transzglutaminázzá alakítja át, amely keresztkötéseket hoz létre a fibrinláncok között és az α_2 -plasmin inhibitort is keresztköti a fibrinhez. Az FXIII-A hiánya súlyos vérzési diathézist okoz, az FXIII-A hiányos betegek rendszeres pótlóterápiát igényelnek.

A nem enzimikus FXIII-B alegység meghosszabbítja az FXIII-A élettartamát a keringésben és megakadályozza annak spontán aktiválódását. Az FXIII-B egy ~80 kDa glikoprotein, amely körülbelül 8,5% szénhidrátot tartalmaz két N-glikozilációs helyen, (Asn142 és Asn525) mely a harmadik és kilencedik sushi-doméneken található.

Ezeknek a glikánoknak sem a szerkezetét, sem a funkcionális szerepét nem vizsgálták még részletesen, annak ellenére, hogy az ilyen módosulások fontosságát számos immunológiai, onkológiai, hematológiai stb. vizsgálat igazolta. A véralvadási kaszkád számos tagja glikoprotein, pl. a II, VII, VIII és IX faktorok (FII, FVII, FVIII és FIX), ami a hozzájuk kapcsolódó szénhidrátok fontosságára utal. Kimutatták, hogy az FVIII stabilitása és makromolekuláris kölcsönhatásai deglikozilációval megváltoznak. Azt is fontos megjegyezni, hogy a glikoziláció elősegítheti a fehérjék oldhatóságát. Továbbá számos terápiás szempontból releváns, rekombináns véralvadási faktor in vivo hatékonyságát növelte a természetes glikozilációjuk.

1.2. XIII-as véralvadási faktor hiány

Az öröklött FXIII-A hiányban szenvedő betegek súlyos vérzéses diathézise egyértelműen jelzi az FXIII fontosságát a hemosztázis fenntartásában. Az általános populációban az FXIII-A hiány a legritkább örökletes véralvadási rendellenességek közé tartozik (egy a kétmillióhoz), de azokban az országokban, ahol a vérrokonsági házasságok gyakorisága magas, különösen, ha a betegség alapító mutációval párosul, a gyakoriság sokkal magasabb.

Az FXIII alegységek bármelyike ellen képződött autoantitestek szintén súlyos, gyakran életveszélyes vérzéses szövödményekhez vezetnek, amelyek halálozási aránya 25% körüli. Ez is meglehetősen ritka kórképnek mondható, egy nemrég megjelent átfogó tanulmányban 48 jól ismert, publikált esetet gyűjtöttek össze, ebből 47-ben FXIII-A- és 1-ben FXIII-B-ellenes antitestek jelenlétét igazolták.

Az autoantitestek megjelenése autoimmun betegséggel állhat összefüggésben, azonban különösen idős betegeknél gyakran idiopátiás. Az autoantitest zavarhatja az FXIII aktiválódását, gátolhatja az FXIIIa transzglutamináz aktivitását, és a fehérjével immunkomplexet alkotva felgyorsíthatja a fehérje kiürülését a keringésből. A fenti kritériumok alapján javasolt az FXIII ellenes antitestek osztályozása.

A diagnózis felállítására és az FXIII-A ellenes autoantitestek gátló erejének mérésére használt klasszikus módszer a Bethesda-Nijmegen-próbán alapul. Javasoltuk a vizsgálat kiegészítését az FXIII aktivációjának/aktivitásának 50%-os gátlásához szükséges beteg immunglobulin G (IgG) koncentrációjának meghatározásával, valamint az FXIII-A és a beteg IgG közötti kötési affinitás meghatározásával.

1.3. A fibrinogén- és XIII faktorszintek változása az ESRD-betegeknél

A végstádiumú vesebetegség (ESRD) a különböző krónikus vesebetegségek végső kimenetele, amely a túléléshez hemodiafiltrációs (HDF)/hemodialízis (HD) kezelést vagy veseátültetést igényel. A HD egyszerűen diffúzióval távolítja el az alacsony molekulatömegű urémiás toxinokat, míg a HDF, bár ugyanazt a típusú dializátort

használja, ugyanolyan pórusmérettel, mint a HD, konvektív transzportot alkalmaz, ami a kis és közepes méretű toxikus fehérjék kiválasztását is lehetővé teszi.

Általánosságban elmondható, hogy az ESRD részben a vérlemezkék károsodott működése miatt fokozott vérzéses rizikót jelent. Paradox módon azonban az artériás és a vénás oldalt egyaránt érintő trombotikus manifesztációk is meglehetősen gyakoriak ebben a betegcsoportban. Ilyen trombotikus szövődmények közé tartozik az ischaemiás stroke, a szívinfarktus, a perifériás artériák elzáródása, a mélyvénás trombózis, a tüdőembólia és az ér hozzáférést biztosító fisztula trombózisa. A vérzéses diathézis és a trombotikus hajlam egybeesése a véralvadási rendszer komplex egyensúlyzavarára utal, a vérlemezkék működése és a fibrinolitikus rendszer változásai is hozzájárulnak a hemosztatikus változásokhoz.

Az ESRD-betegek állapotának és kezelésének egyéni eltérései hozzájárulhatnak a klinikai vérzéses tünetek változatosságához. Az általános funkcionális teszteket és a különböző hemosztatikus paraméterek meghatározását egyaránt alkalmazták az ESRD-betegek hemosztatikus egyensúlyának jellemzésére és a megváltozott hemosztázishoz vezető patomechanizmus feltárására. Az alvadási rendszerrel kapcsolatban végzett vizsgálatok elsősorban a fokozott trombin generációt eredményező paraméterekre irányultak. A rendszeres hemodialízisben részesülő ESRD-betegeknél a trombogenezis markerei, köztük a trombin-antitrombin komplex, a protrombin 1.2 fragmentum, a D-dimer, a fibrinopeptid A és a VIII-as faktor emelkedtek, ami az alvadási kaskád intravaszkuláris aktiválódására utal.

Jelen tanulmányban arra voltunk kíváncsiak, hogy a véralvadási kaskád végső szakaszának alkotóelemeit hogyan befolyásolja maga az ESRD és annak kezelési módjai.

A fibrinogén és az FXIII kulcsfontosságú szerepet játszik a fibrin alvadék kialakulásában és stabilizálásában. Az FXIII tetramer szerkezetű, két potenciálisan aktív A alegységből (FXIII-A) és két védő/gátló B alegységből (FXIII-B) áll. Az aktiváció során a trombin eltávolít egy 37 aminosavból álló aktivációs peptidet az FXIII-A N-terminális részéről, és Ca^{2+} jelenlétében a hasított FXIII-A felveszi az enzimatikusan aktív konfigurációt. Az aktív FXIII (FXIIIa) egy transzglutamináz, amely izopeptidkötések révén keresztkötéseket hoz létre a fibrin α -, és γ -láncai között és az α_2 -plazmin inhibitort ($\alpha_2\text{PI}$), a fibrinolízis fő inhibitorát a fibrin α -láncaihoz kapcsolja. Így teszi a fibrint ellenállóvá a keringő vér nyírófeszültségével és a fibrinolitikus rendszer

proteolitikus lebontásával szemben. ESRD-ben a fibrinogén, az FXIII és az α_2 PI változásáról ezidáig csak szórványos eredményekről számoltak be; azonban ezen paraméterek átfogó elemzése ebben a betegcsoportban még mindig hiányzik.

2. Célkitűzés

1. Vizsgálatunk célja az volt, hogy átfogóan jellemezzük az FXIII-B-n található N-glikánok szerkezetét és megvalósítsuk a glikánok eltávolítását nem denaturáló körülmények között olyan további biokémiai kísérletekhez, mely elősegíti, hogy jobban megismerjük az FXIII-B glikozilációjának biológiai jelentőségét. Ebben a tanulmányban a deglikoziláció hatását vizsgáltuk az FXIII-B dimer szerkezetére és plazma clearance-ére nézve.
2. Jelen tanulmányban egy autoantitestes, FXIII-A hiányos beteget vizsgáltunk, akinél szokatlan laboratóriumi és klinikai jellemzők mutatkoztak. Az eredmények lehetővé tették, hogy rámutassunk a diagnosztikai folyamat nehézségeire, és teszteljük az antitestek jellemzésére javasolt újszerű megközelítést azzal a céllal, hogy ezeket a technikákat bevezessük a laboratóriumi gyakorlatba. A betegnél fellépő, szokatlan trombotikus klinikai szövődmény felhívja klinikusok figyelmét arra, hogy a gátló hatású FXIII-A ellenes antitest jelenléte nem nyújt védelmet a tromboembóliával szemben.
3. Jelen vizsgálat célja az volt, hogy feltárja a fibrinképződésben és a fibrin alvadék stabilizálásában fontos szerepet játszó faktorokkal kapcsolatos új ismereteket ESRD-betegyek esetén.
 - a. Meghatároztuk a fibrinogén és FXIII antigén koncentrációját, valamint FXIII aktivitását ESRD betegeknél, és összehasonlítottuk a HDF és a HD kezelések hatását ezen paraméterekre nézve.

- b. Azt is megvizsgáltuk, hogy a C-reaktív fehérje (CRP) mérésével azonosított gyulladásos folyamatok befolyásolják-e ezeket a paramétereket, és hogy a fibrinogén koncentrációja összefügg-e más vizsgált paraméterekkel.
- c. Míg a tanulmány első részében az ESRD, valamint a HDF és HD kezelések hosszú távú hatásait vizsgáltuk, a második részben a tényleges HDF vagy HD kezelés rövid távú hatásait vizsgáltuk. Ez utóbbi esetben a négyórás HDF- és HD-kezelések során a fibrinogén- és FXIII-szintek változását követtük nyomon. A dialíziskezelések során bekövetkező plazmavízcsökkenés és annak fehérjekoncentrációra gyakorolt hatásának figyelembevétele érdekében a fenti paramétereket albumin koncentrációra korrigálva is kiszámítottuk.

3. Betegek és módszerek

3.1. A XIII-as véralvadási faktor B alegységének N-glikozilációja és funkcionális következményei

3.1.1. PNGase F emésztés natív körülmények között

Nyolcvan mikrogramm FXIII-B-t 50 μ L 20 mmol/L NaHCO₃-ban (pH 7,0) oldottunk fel, majd 10 μ L-ben 8,1 mU PNGáz F enzimet adtunk hozzá, azaz tízszer nagyobb mennyiséget, mint amit a denaturált fehérjékhez szokásosan használunk. Ezt a reakcióelegyet 10 kDa spin-szűrőre (VWR, Radnor, PA) vittük át, és egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. Ezután 100 μ L HPLC minőségű vizet (Millipore, Darmstadt, Németország) adtunk a reakcióelegyhez, majd a felszabadult N-glikánokat spin-szűrőn keresztül 11 270 $\times$ g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a fluorofór jelölés előtt SpeedVac rendszerben (Thermo Scientific) szárítottuk. A megmaradt pelletet 50 μ L 20 mmol/L pH 7,0 NaHCO₃ pufferben oldottuk fel, és 1 μ L (0,81 mU) PNGáz F enzimmel újra emésztettük, egy éjszakán át 37°C-on inkubálva. Ezután 100 μ L HPLC minőségű vizet adtunk a reakcióelegyhez, majd a felszabadult N-glikánokat 10 percig 11 270 $\times$ g-n

centrifugáltuk a spin-szűrőn keresztül, majd a fluorofór jelölés előtt SpeedVac rendszerben szárítottuk.

3.1.2. PNGase F emésztés denaturáló körülmények között

A natív fehérje 3.1. pontban leírtak szerinti emésztése után a megmaradt pelletet denaturáltuk és PNGáz F-fel újra emésztettük. A pelletet 10 μL nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás (HPLC) tisztaságú vízben feloldottuk, és 1 μL denaturáló puffert (400 mmol/L DTT, 5% SDS) adtunk a 10 kDa szűrőn lévő keverékhez. A 65 °C-on 10 percig tartó inkubálás után 100 μL HPLC tisztaságú vizet adtunk hozzá, majd a szűrőt 10 percig 11 270 $\times$ g-n centrifugáltuk a maradék denaturáló puffer eltávolítása érdekében. Az FXIII-B-t in situ emésztettük a szűrőn 49 μL 20 mmol/L NaHCO_3 puffer (pH 7,0) és 1 μL (0,81mU) PNGáz F hozzáadásával. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Ezután 100 μL HPLC tisztaságú vizet adtunk a reakcióelegyhez, majd a felszabadult N-glikánokat 11 270 $\times$ g-n 10 percig centrifugáltuk a spin-szűrőn keresztül. A mintákat SpeedVacben beszárítottuk. A felszabadult N-glikánokat ezután APTS-szel jelöltük az alábbiakban leírtak szerint. A denaturáló protokoll szerinti PNGáz F-fel kezelt FXIII-B mintával kapott eredményeket összehasonlításként használtuk a nem denaturált FXIII-B emésztés hatékonyságának megállapításához.

3.1.3. Fluorofór jelölés

Hat mikroliter 20 mmol/L APTS-t 15%-os ecetsavban és 2 μL 1 mol/L NaCNBH_3 -t (THF-ben) adtunk a szárított glikán mintákhoz, és 37°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A jelölt mintákat mágneses gyöngyökkel tisztítottuk (SCIEX Fast Glycan Sample Preparation and Analysis kit) a készlet használati utasítása szerint, és azonnal elemeztük

kapilláris elektroforézissel lézer indukált fluoreszcencia detektálással (CE-LIF) vagy - 20°C-on tároltuk a későbbi munkához.

3.1.4. Exoglikozidáz alapú szénhidrát szekvenálás

Négy mikroliter HPLC tisztaságú vizet és 1 μ L 50 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ puffert (pH 7,5) adtunk 5 μ L APTS-szel jelölt N-glikánhoz. Ezt az elegyet 37°C-on egy éjszakán át emésztettük α (2-3,6,8,9) szialidáz A, α (1-2,3,4,6) fukozidáz, β (1-4,6)-galaktozidáz és β (1-2,3,4,6)-N-acetilhexozaminidáz elegyével. Az emésztett mintákat SpeedVac-ben megszárítottuk, majd CE-LIF segítségével elemeztük.

3.1.5. Kapilláris elektroforézis lézer indukálta fluoreszcens detektálással (CE-LIF)

Minden kapilláris elektroforézis analízist a P/ACE MDQ rendszeren (SCIEX) végeztünk. Az elválasztásokat LIF-detektálással követtük nyomon, 488 nm-es Ar-ion lézerrel, 520 nm-es emissziós szűrővel. Ötven cm effektív hosszúságú (összesen 60 cm), 50 μ m belső átmérőjű szilícium-dioxid kapillárisokat alkalmaztunk N-CHO elválasztó gél pufferrel (mindkettő a SCIEX-től) az analízishez. A mintákat 5 másodpercig 1 psi nyomáson injektáltuk, és az elválasztást fordított polaritású üzemmódban, 30 kV alkalmazásával végeztük. Az adatgyűjtéshez és feldolgozáshoz a 32 Karat szoftvert (SCIEX) használtuk.

3.1.6. Molekulatömeg meghatározás gélszűréssel

A natív és deglikozilált FXIII-B-t gélszűréssel elemeztük ÄKTA-komatográfiás rendszerrel (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország). A méret-kizárásos kromatográfiát HiPrep™ 16/60 Sephacryl®S-300 HR oszlopon (GE-Healthcare, Chicago, IL) végeztük. Az eluálás szobahőmérsékleten Tris-pufferelt sóoldatban (50

mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7,4) 0,5 ml/perc áramlási sebességgel történt. A fehérjék eluálását 214 nm-en követtük nyomon. A kalibrációs görbéhez standardként tiroglobulint, ferritint, aldolázt, konalbumint és ovalbumint használtunk (GEHealthcare, Chicago, IL).

3.1.7. F13B knock-out egérvonal létrehozása és a genotipizálási stratégia

Az F13B knock-out (KO) egerek előállítása során az F13B gén kiütésére CRISPR/Cas9 technológiát használtunk oly módon, hogy inframe-stop-kodonokat juttattunk a második exonjába. A módosított gén transzlációja az első exon transzlációs iniciációs helyéről indult, de miután az összes 669 aminosavból 29 beépült, leállt. A módosítás a Cas9 enzim révén a cr/tracr RNS-ek (IDT) által irányított kétszálú hasításon és a homológiára épülő javításon alapul, amelyhez a kívánt mutációt tartalmazó templátot egy egyszálú oligodezoxinukleotid (ssODN) templáton (IDT) biztosítottuk. A crRNS célspecifikus szekvenciája a következő volt: ATCCTTCCATTTTCCACGGT. Cas9 fehérjét (30 ng/μl), cr/tracrRNS-t (1-1 pmol/μl) és ssODN-t (15 ng/μl) mikroinjektáltunk a C57Bl/6NTac egerek megtermékenyített petéinek pronukleuszaiba. Az ssODN-templát sorrendje (a módosított bázisok félkövér és dőlt betűvel vannak szedve): CCTCTCAGGAGAACTCTATGCAGAAGAGAAACAGTGTGATTTTCCT***TAGTGA*** GGAAAATGGAAGGATTGCCCAATATTATTATACGTTTAAAAGCTTTT.

A genotipizáláshoz polimeráz láncreakciót (PCR) használtunk. Először az alapító egerekből amplifikáltuk a célrégiót PCR-rel, F13B specifikus general forward (TGCAAAGTGAAGATCTGCCG) és reverz (TGTAGCACCTTGGGTTTGGAG) primerekkel, és ellenőriztük a szekvenciát. A szekvenálást megismételtük az F1 generációban. Vad típusú és knock out (KO) specifikus forward primereket (AACAGTGTGATTTTCCTACCGTG és AACAGTGTGATTTTCCTTAGTG) a general reverz primerekkel együtt használtuk a genetikai módosítást hordozó egerek azonosítására.

3.1.8. A deglikozilált FXIII-B clearance vizsgálata

A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta. A natív és deglikozilált FXIII-B keringésből való kiürülésének vizsgálata és összehasonlítása céljából 100 µl 300 µg/ml natív, nem deglikozilált ill. deglikozilált FXIII-B-t injektáltunk hét, illetve hat FXIII-B knock out egér farokvénájába. A deglikozilált FXIII-B előállítása a 4.1.3 részben leírtaknak megfelelően történt. Mindkét csoportban 2-2 hímnemű egér volt. A kísérletben résztvevő egerek 8-12 hetesek voltak. A nem deglikozilált és a deglikozilált FXIII-B-t kapó egerek testtömeg értékei $22,3 \pm 2,6$ ill. $22,2 \pm 2,3$ g volt. Az egerektől az FXIII-B alegységek beadását követően 1, 48 és 120 órával később izofuránnal végzett anesztézia mellett heparinizált kapillárisban, 150 µl vért vettünk a retro-orbitális sinusból. A levett vérmintákból a plazmát 1300 x g-n, 15 percig tartó centrifugálással nyertük. Az összegyűjtött plazmamintákat az FXIII-B ELISA technikával történő analízisig -20°C -on tároltuk.

3.1.9. FXIII-B koncentráció meghatározása

A KO egerektől begyűjtött plazma mintákból az FXIII-B koncentrációját egy az intézetünkben korábban kifejlesztett, egylépéses ELISA technikával határoztuk meg. Ennek során a sztreptavidinnel fedett mikrolemezeken 0,5 mol/L NaCl-ot, 0,05% Tween 20-at és 5 g/L szarvasmarha szérumalbumint (BSA) tartalmazó 0,15 mol/L (pH: 7,2) foszfát pufferrel hígított plazma mintákhoz, biotinált FXIII-B ellenes elfogó és torna-peroxidázzal (HRPO) jelzett FXIII-B ellenes detektáló monoklonális antitesteket adtunk. A két FXIII-B ellenes antitest különböző epitópok ellen irányult és a szabad, ill. komplexben lévő FXIII-B-hez egyformán kötődött. A keveréket 1 órán keresztül inkubáltuk, majd 3 x 300 uL foszfát pufferrel történő mosást követően tetrametilbenzidint (TMB, 200 µL, 0,1 mg/L) és 0,006%-os H_2O_2 -t tartalmazó foszfát puffert (0,05 mol/L, pH: 5) adtunk a mikrolemez vályúiba. 30 perc múlva a reakciót H_2SO_4 -gyel (2 mol/L, 50 µL) állítottuk le és az abszorbanciát 450 nm-en iEMS Reader MF microplate készüléken (Labsystem, Budapest, Magyarország) mértük.

3.2. Autoimmun XIII-as faktor hiány szokatlan laboratóriumi és klinikai fenotípussal

3.2.1. Esetleírás

Az általunk vizsgált minták egy 67 éves francia nemzetiségű nőtől származnak, akinek kórtörténetében magas vérnyomás, kóros elhízás (súly 114 kg) és térdízületi gyulladás szerepelt. A korábban elvégzett vakbélműtét, 3 császármetszés és egy nemrégiben elvégzett szürkehályog műtétek során vérzéses komplikációk nem léptek fel. Kórelőzményében spontán vérzés nem fordult elő.

A beteg 2017 novemberében rövid időre kórházba került a térdébe kapott kortizon injekció miatt. A kórházi kezelések során egy minor traumát követően néhány nappal később nagyméretű muszkuláris hematoma alakult ki mindkét combján (a jobb oldalon 220x97mm, a bal oldalon 195x55mm). A 8 vörösvérsejt transzfúzió ellenére, a hemoglobinja továbbra is alacsony maradt. Ebben az időszakban 45 napot töltött kórházban, melynek során a helyes diagnózist nem sikerült felállítani.

2018 januárjában orvosi konzultációra érkezett a Dijoni egyetemi kórház hemofília központjába. A kiterjesztett hemosztázis vizsgálatok során csökkent FXIII szintet igazoltak a betegnél. Berichrom assay-vel (Dade, Behring Marburg, Németország) 17% FXIII aktivitást mértek. Elvégezték az FXIII mutációs génanalízisét (exonok és határoló intron régiók kétirányú szekvenálása), azonban mutációt nem detektáltak. Keveréses vizsgálatot is végeztek, melynek eredménye felvetette az FXIII ellenes antitest jelenlétét. Bethesda Nijmegen assay-vel 1,51 BU antitest titert igazoltak. Egyéb alvadási faktor defektust nem találtak. A klinikai, radiológiai és laboratóriumi vizsgálatok nem tárták fel az FXIII ellenes antitest jelenlétének okát. Nem találtak bizonyítékot más autoimmun betegsége, fertőző betegsége vagy neopláziára.

2018 májusában hasi fájdalom miatt komputertomográfias vizsgálatot végeztek, melynek során egy nagyméretű hematomát azonosítottak a rekeszizom jobb szárában. Az FXIII szubsztitúciót 5000 IU (44 UI/kg) Fibrogammin®-nal (CSL Behring, Marburg, Németország) kezdték, majd ezt 6 órával később megismételték. A beteg FXIII aktivitás értékeit az infúzió után 30 perccel, 1- majd 2 órával levett mintáiból 17-20%-nak mérték Berichrom assay-vel. Intervenciós radiológia segítségével embolizációt végeztek a vérzés

megállítása céljából. Ezen kívül a beteg naponta háromszor 1 g tranexámsavat és két vörösvérsejt transzfúziót kapott.

2018 júniusában a beteg ismét kórházba került spontán kialakult hematomákkal a rekeszizom bal szárában és a rectus abdominis izomban (45 mm x 116 mm x 65 mm). Az FXIII szubsztitúció ellenére a vérzést nem tudták kontrollálni, ezért egy újabb embolizációt végeztek a vérzés megállítása céljából. A beteg 11 vérlemezke- és 4 vörösvérsejt transzfúziót kapott. Az autoantitestek felszámolása céljából az alábbi stratégiát alkalmazták: 2018 májusában a második vérzéses tünet megjelenését követően, az 1. naptól a 14. napig 1 mg/kg/nap prednizolont kapott, amelyet a 15. naptól folyamatosan csökkentettek. Emellett 0,7 g/kg immunglobulint adtak 2 egymást követő napon (1. és 2. nap) és a beteg 1 g Rituximab®-ot is kapott. A 2018. júniusában a második kórházi kezelés során 3 egymást követő napon (13.-tól 15.-ig nap) 0,7 g/kg immunglobulinnal kezelték. Emellett 6 ciklusban kapott 10 mg/kg ciklofoszfamidot (21., 35., 49., 70., 91. és 112. napokon), valamint 1 g Rituximab®-ot a 18. napon. Az alkalmazott kezelések azonban nem befolyásolták a beteg FXIII szintjét. 4 hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg váratlanul mélyvénás trombózist kapott, mely pulmonáris embóliával társult.

A beteg mintái ezt követően kerültek tanszékünkre, ahol az intézetünkben kifejlesztett Technochrom FXIII assay-vel elvégeztük az FXIII aktivitás meghatározásokat, továbbá detektáltuk és karakterizáltuk a betegben jelenlévő FXIII ellenes autoantitesteket.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásaitikai Bizottságának jóváhagyásával történt.

3.2.2. Fehérje preparálás

A kísérletekben használt tisztított FXIII-A₂B₂-t humán plazmából állítottuk elő. A rekombináns FXIII-A₂ (rFXIII-A₂) Dr. E Olsen (Novo Nordisk, Måløv, Dánia) kedves ajándéka volt. A betegtől és a normál egyénektől származó IgG-t affinitás kromatográfiával izoláltuk, HiTrap Protein G HP oszlop (Amersham, Uppsala, Svédország) segítségével.

3.2.3. Plazma FXIII aktivitás és antigén szintjének meghatározása

A betegből származó mintákat 0,109 M trinátrium-citrátot tartalmazó csövekbe gyűjtötték és a plazma kinyeréséhez centrifugálták Dijonban, Franciaországban. A mintákat -80°C hőmérsékleten tárolták a Debrecenbe történő szállításig.

A plazma FXIII aktivitását Dijonban és Debrecenben is módosított ammónia felszabadulási teszttel mértük Berichrom® FXIII assay kit (Marburg, Németország), illetve a Technochrom® FXIII assay kit (Bécs, Ausztria) segítségével. Az FXIII-A₂B₂ komplex, az FXIII-A és az FXIII-B antigén szintjét ELISA módszerrel határoztuk meg.

3.2.4. A beteg IgG FXIII-hoz való kötődésének vizsgálata

A beteg IgG FXIII-A₂-höz való kötődési affinitását felületi plazmonrezonancia (SPR) segítségével mértük a Biacore 3000 műszerrel (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság). A beteg IgG-jét a CMD szenzorchip (XanTec, Düsseldorf, Németország) 2. áramlási cellájára (FC2) immobilizáltuk. Az 1-es kontroll áramlási cellát (FC1) normál IgG-vel fedtük le. Analitként különböző koncentrációjú rFXIII-A₂-t használtunk 10 mM HEPES-ben, 150 mM NaCl-ban, 3 mM EDTA-ban, 0,005 % (v/v) surfactant-ban (pH 7,4).

Az asszociációs sebességi állandó (k_a), a disszociációs sebességi állandó (k_d), az egyensúlyi disszociáció (K_d) és az affinitási állandó (K_a) kiszámítása a BIAevaluation szoftverrel (GE Healthcare) történt.

3.2.5. FXIII aktiváció/aktivitás gátlásának vizsgálata

Az FXIII ellenes inhibitor gátló hatását a Nijmegen szerint módosított Bethesda teszttel értékeltük. A beteg IgG 50%-os gátló koncentrációját (IC_{50}) a következőképpen határoztuk meg: 8,3 µg /mL FXIII-A₂B₂-t inkubáltunk különböző koncentrációjú normál és beteg IgG-vel 50 mM HEPES-ben, 100 mM NaCl-ban (pH 7,4), 60 percig a 37°C-on.

Ezután az FXIII-at 20 U/mL humán trombinnal és 10 mM CaCl₂-dal aktiváltuk, majd az FXIII aktivitását ammónia felszabadulási teszttel mértük.

A beteg IgG hatását az FXIII-A trombin általi proteolitikus hasítására Western blot technikával vizsgáltuk. Ebben az esetben 8,3 µg/mL FXIII-A₂B₂-t 300 µg/mL beteg vagy normál IgG-vel inkubáltunk HEPES-pufferelt sóoldatban (pH 7,4) 37°C-on, 60 percig. Ezután az FXIII-t 5 U/mL humán trombinnal és 10 mM CaCl₂-dal aktiváltuk. Különböző időtartamú inkubáció után aliquotokat vettünk ki a western blot analízishez. A detektáláshoz bárányban termeltetett poliklonális anti-FXIII-A IgG antitestet (Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada) és Vectastain ABC kit-et (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) használtunk.

Szintén vizsgáltuk a beteg IgG hatását a Ca²⁺ indukált aktivációra nézve. Ennek érdekében 8,3 µg/mL trombinnal hasított FXIII-at 300 µg/mL beteg vagy normál IgG-vel inkubáltunk 37°C-on, 60 percig, majd 10 mM CaCl₂-vel aktiváltuk, és mértük a transzglutamináz aktivitást.

Végül megvizsgáltuk a beteg IgG trombinnal és a Ca²⁺ aktivált FXIII-ra (FXIII-A*2) kifejtett hatását. Ennek során az FXIII-t 20 U/mL trombinnal és 10 mM CaCl₂-dal aktiváltuk, majd a már aktivált FXIII-t (FXIIIa) 300 µg/mL beteg vagy normál IgG-vel inkubáltuk 60 percig, 37°C-on. Az inkubációt követően mértük az FXIII aktivitását.

3.3. Fibrinogén- és XIII faktor szintek hemodiafiltrációs és hemodialízis kezelésben részesülő ESRD betegekben

3.3.1. Betegek és mintavétel

A vizsgálatba harminc, krónikus dialíziskezelésben részesülő ESRD-beteget (15 nő és 15 férfi) vontunk be. Életkoruk 18-70 év között volt (medián: 57 év, interkvartilis tartomány: 41,5-64,5 év). A diabetes mellitusban, rosszindulatú betegségben és hematológiai vagy vérzési rendellenességben szenvedő betegeket kizártuk. A beválogatáskor az ESRD-betegek már legalább tizenkét hónapja részesültek HDF-

kezelésben, amely a dialízisközpontunkban a preferált kezelési mód volt (a HDF-kezelés medián időtartama: 54 hónap, interkvartilis tartomány: 33-108 hónap).

A vizsgálatok során modalitásváltásra került sor, két hétig tartó HD-kezelésre állították át a betegeket, majd ezt követően ismét visszaállították a HDF-kezelést. A dialízis kezeléseket hetente háromszor végezték, és egy kezelés mindkét kezelési módozat esetében 240 percig tartott. Az aktuális HDF- vagy HD-kezelés előtt, valamint egy és négy órával az aktuális kezelés megkezdése után perifériás vérmintákat vettünk vakutainer csövekbe (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), amelyek 0,109 mol/l nátrium-citrátot tartalmaztak. A citrátos vérből a plazmát centrifugálással (1500 x g, 20 perc, 4°C) választottuk el, a plazmaminták aliquotjait a további elemzésig -70°C-on tároltuk.

A kutatás a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával történt. A vizsgálat teljes mértékben megfelel a Helsinki Deklaráció etikai elveinek, minden egyén írásos és szóbeli tájékoztatást követően írásos beleegyezését adta a vizsgálatban való részvételhez.

3.3.2. Laboratóriumi mérések

Az FXIII aktivitást ammónia felszabadulási teszttel határoztuk meg, vak korrekció mellett, TECHNOCHROM® reagens készlet (Technoclone, Bécs, Ausztria) felhasználásával, Modular EVO P800 analizátoron (Roche/Hitachi, Mannheim, Németország). A komplex FXIII-antigén (FXIII-A₂B₂) koncentrációját ELISA-val mértük.

A plazma fibrinogén koncentrációját Clauss-módszerrel határoztuk meg a Labexpert LX fibrinogén assay kit (Labexpert Kft., Debrecen, Magyarország) segítségével.

A CRP-koncentrációjának mérésére a nagy érzékenységű CRP (HS) reagens készletet (Diagnosticum Kft. Budapest, Magyarország) használtuk.

A szérum albumin koncentrációját a Roche/Hitachi cobas c rendszeren a brómkrezol lila abszorpció módszerrel mértük.

3.3.3. Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzését a Statistical Package for Social Science (SPSS, 22.0, Chicago, IL, USA) és a GraphPad Prism 5.0 verziójával (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) végeztük. Az adatok eloszlását a Kolmogorov Smirnov-tesztel értékeltük. Az ábrák szerkesztéséhez a GraphPad Prism szoftvert használtuk. Nem parametrikus eloszlás esetén a HDF-kezelést követően és a kéthetes HD-kezelést követően mért eredményeket Wilcoxon előjeles rangtesztel, míg parametrikus eloszlás esetén t-próbával hasonlítottuk össze.

Az egyes HDF- és HD-kezelések megkezdése előtt, valamint az egy és négy órával a kezelés megkezdése után levett mintákból mért paraméterek különbségeit Friedman-tesztel (nem parametrikus eloszlás) vagy ismételt méréses ANOVA-tesztel (parametrikus eloszlás) hasonlítottuk össze. A különböző paraméterek közötti összefüggést Spearman-féle rangkorrelációval elemeztük.

4. Eredmények

4.1. A XIII-as véralvadási faktor B alegységének N-glikozilációja és funkcionális következményei

Az FXIII-B glikán struktúrájának karakterizálása érdekében először a denaturált fehérje aszparaginhoz kötött szénhidrát komponenseinek átfogó analízisét végeztük el. A denaturált FXIII-B alegységről az N-glikánokat PNGase F-fel vágtuk le, a felszabadult cukor komponenseket APTS-szel jelöltük és a mágneses gyöngyökkel történő tisztítási lépést követően CE-LIF technikával analizáltuk. A fehérje denaturálására azért volt szükség, hogy a glikoprotein teljesen ki tudjon tekeredni, ezáltal biztosítva az endoglikozidáz enzim teljes hozzáférését az N-kapcsolt cukor struktúrák hasításához.

Ezenkívül az FXIII-B exoglikozidáz emésztését is elvégeztük az adatbázisban javasolt struktúrák ellenőrzésére. A denaturált FXIII-B-ről a szialidázt, szialidázt + β -galaktozidázt, szialidázt + β -galaktozidázt + fukozidázt és szialidázt + β -galaktozidázt +

fukozidázt tartalmazó exoglikozidáz-keverékek matrix szerűen történő hozzáadásával szabadítottuk fel az N-glikánokat, melyet APTS-szel jelöltünk.

Az exoglikozidáz enzimekkel végzett szekvenálás eredményeként az alábbi struktúrákat azonosítottuk: egy trisialo (A3G(4)3S(6,6,6)3), egy bisialo (A2G(4)2S(6,6)2), egy diszialo bisecting (A2BG(4)2S(6,6)2), egy disialo core-fukozilált (F(6)A2G(4)2S(6,6)2), egy disialo core-fukozilált bisecting (F(6)A2BG(4)2S(6,6)), egy monoszialilált bisecting (2A2[3]BG(4)1S(6)1), egy monoszialilált (A2G(4)2S(6)1) és két monoszialilált core-fukozilált (F(6)A2[6]G(4)2S(6)1), F(6)A2[3]G(4)2S(6)1. A rövidített glikán szerkezeti elnevezések és jelölések Harvey és munkatársai által javasolt nomenklatúra alapján történtek.

Mivel szintén kíváncsiak voltunk az FXIII-B nem-denaturáló körülmények között történő deglikozilációjának hatékonysága is, ezért a natív fehérjét denaturálás nélkül, egy kétlépeses protokoll segítségével PNGase F-fel emésztettük. Ennek első lépéseként a fehérjét a denaturált körülmények esetén alkalmazott PNGase F 10-szeres mennyiségével emésztettük. Ezt a lépést a PNGase F normál koncentrációval történő emésztése követte, melyet az anyagok és módszerek részben részletesen leírásra került. A natív fehérje ismételt PNGase F emésztése két különböző koncentrációban sikeres deglikozilációt eredményezett, amely a fehérjéhez kapcsolódó szénhidrát struktúrák hiányának igazolásával nyert megerősítést. Ebben a kísérletben a nem-denaturált FXIII-B-t, mely a kétlépeses emésztési protokollt követően visszamaradt, denaturáltuk és ezt követően alávetettük egy ismételt PNGase F emésztésnek. Az első, nem denaturáló körülmények között végzett PNGase F emésztés a szénhidrát komponensek körülbelül 70%-át távolította el az FXIII-B glikozilációs helyeiről. A második, szintén natív körülmények között történő PNGase F kezelés láthatóan eltávolította a cukorstruktúrákat. A visszamaradt pellet denaturálása és újbóli PNGase F emésztése már nem eredményezett detektálható glikánokat, bizonyítva ezzel a natív fehérje teljes deglikozilációját.

Tudomásunk van arról, hogy idáig csak egyetlen kísérletet tettek az FXIII-B deglikozilálására; ebben az esetben azonban nem vizsgálták a deglikoziláció mértékét, a felszabaduló szénhidrátok összetételét és a deglikoziláció teljességét. A natív FXIII-B teljes deglikozilációja, ahogyan azt ebben a tanulmányban leírtuk, eszközt nyújt a fehérjéhez kapcsolódó N-glikán szerkezet funkcionális/szerkezeti szerepének feltárásához.

Itt először azt vizsgáltuk, hogy a deglikoziláció befolyásolja-e az FXIII-B dimer szerkezetét. Az FXIII-B dimer kialakulásáért felelős helyek a negyedik és kilencedik sushi-doménen vannak, és figyelembe véve a glikánrészek közelségét ezekhez a helyekhez, feltételezhető, hogy befolyásolhatják az FXIII-B dimerizációját. Gélfiltrációs kísérleteink alapján a deglikozilált FXIII-B molekulatömege valamivel kevesebbnek bizonyult, mint az N-glikánokat tartalmazó formáé. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen a cukorkomponensek el lettek távolítva a fehérjéről. A két forma molekulatömegének közelsége jól jelzi, hogy az FXIII-B dimer szerkezete a deglikozilációt követően is megmaradt.

A deglikoziláció hatását az FXIII-B keringésben való élettartamára nézve FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk. A fajok közötti különbség, azaz, hogy humán FXIII-B-t injektáltunk egérbe, valószínűleg befolyásolta és fel is gyorsította az elimináció sebességét. Humán vonatkozásban nem állnak rendelkezésre adatok a szabad FXIII-B plazmában való félélet idejére nézve. A natív humán FXIII-B eliminációs rátája az FXIII-B knock-out egerekben gyorsabb volt a vártnál, a gyorsabb fehérje elimináció betudható a fajok közötti különbségeknek. Azonban az erőteljes különbség a natív és a deglikozilált humán FXIII-B₂ eliminációs sebessége között, azt sugallja, hogy a szénhidrát komponensek jelenléte meghosszabbítja a fehérje félélet idejét a keringésben.

4.2. Autoimmun XIII-as faktor hiány szokatlan laboratóriumi és klinikai fenotípussal

Az általunk vizsgált 67 éves nő, rövid időre kórházba került a térdébe kapott kortizon injekció miatt. A kórházi kezelése során egy minor traumát követően néhány nappal később nagyméretű muskuláris hematoma alakult ki mindkét combján. Korábban spontán vérzést és műtét utáni vérzéses szövődményt nem jegyezték fel. Nyolc vörösvérsejt-transzfúzió ellenére a hemoglobin-koncentrációja alacsony maradt. Több téves diagnózissal 45 napig volt kórházban. Ezt követően a Dijoni Egyetemi Kórház Hemophilia Care Centerében tartott orvosi konzultáció során FXIII-hiányra gyanakodtak, és 17%-os FXIII-aktivitást mértek vak kompenzáció nélkül, Berichrom assay (Dade Behring) segítségével.

Az ilyen mértékű FXIII deficiencia azonban nem magyarázza a betegnél jelentkező súlyos vérzéses komplikációkat. Ezért intézetünkben Technochrom assay-vel a beteg mintáiból ismételten elvégeztük az FXIII aktivitás meghatározásokat. Vak korrekció nélkül mi is hasonló, 18,5%-os FXIII aktivitást mértünk, azonban a vak korrekció alkalmazásával végzett mérések egyértelműen igazolták, hogy a beteg valódi FXIII aktivitása a detektálhatósági határ alatt volt. A beteg mérhetetlenül alacsony FXIII aktivitás értékeit, az FXIII fibrin keresztkötő képességének teljes hiánya szintén alátámasztotta. Az FXIIIa1 génben az exonok és a kísérő intron régiók kétirányú szekvenálásával mutációt nem azonosítottak.

A betegben jelenlévő FXIII ellenes gátló hatású autoantitesteket keverékes vizsgálattal detektáltuk és a Bethesda-Nijmegen assay alapján 74 Bethesda unitnak (BU) mértük. ELISA technikával sem FXIII-A₂B₂-antigént sem FXIII-A₂-antigént nem tudtunk detektálni a beteg plazmájából. Ezzel szemben az FXIII-B antigén szintje a referencia intervallumon belül volt. A Western-Blot analízis során ellentmondó eredményre jutottunk, ugyanis jelentős mennyiségű FXIII-A-t tudtunk detektálni a beteg plazma mintájából. Ezen eredmények hátterében az állt, hogy a beteg plazmájában jelenlévő autoantitest interferált az ELISA módszerben alkalmazott monoklonális FXIII-A ellenes antitestekkel.

A közelmúltban további technikákat javasoltak a faktorelles autoantitestek pontosabb jellemzésére, különösen az FXIII ellenes autoantitestek esetén. Esetünkben az autoantitest rekombináns FXIII-A₂-vel szembeni affinitását felületi plazmonrezonancia (SPR) segítségével határoztuk meg Biacore 3000 műszerrel. A várakozásoknak megfelelően az antitest nagy affinitást mutatott az FXIII-A₂-höz, a KD értéke $2,77 \pm 0,66 \times 10^{-9}$ mol/L-nek adódott.

Az inhibitor titer Bethesda-Nijmegen meghatározása mellett, elvégeztük a beteg IgG-jének 50 %-os gátló hatását eredményező koncentráció (IC₅₀) értékének meghatározását is. Méréseink során az 50%-os gátló hatást $74 \pm 8,6$ µg/ml IgG koncentrációnál értük el, míg 300 µg/ml-es koncentráció felett az FXIII aktivitás csaknem teljes gátlása volt megfigyelhető. Egészséges egyénektől származó IgG esetén még a legmagasabb koncentráció mellett sem tapasztaltunk gátló hatást.

A betegben megjelenő autoantitestek gátolhatják az FXIII-A trombin által történő hasítását, a Ca²⁺ indukálta strukturális átrendeződést és az FXIIIa transzglutamináz

aktivitását. Az autoantitest kombinált gátló hatás kifejtésére is képes lehet. Ezért az autoantitest gátló hatásának jellemzése céljából külön-külön megvizsgáltuk ezeket a lehetőségeket.

A beteg IgG hatását az FXIII-A trombin általi proteolitikus hasítására nézve Western-blot technikával vizsgáltuk. Az idő előrehaladtával az FXIII-A hasítása normál és a beteg IgG jelenlétében, arra utalt, hogy az inhibitor az AP-FXIII trombin által történő lehasítását nem gátolta, ugyanis a nem hasított FXIII-A-nak megfelelő sávok intenzitása azonos mértékben csökkent a beteg, illetve a normál IgG jelenlétében.

Vizsgáltuk a beteg IgG kombinált hatását a Ca^{2+} által indukált FXIII-aktivációra és az FXIIIa aktivitására is. Ebben a felállásban a beteg IgG közel teljes (92,3%) gátlást gyakorolt.

Végezetül megvizsgáltuk a beteg IgG FXIIIa-ra kifejtett hatását. Ebben az esetben az FXIIIa beteg IgG által történő gátlása mérsékelt volt: 300 $\mu\text{g/ml}$ IgG a transzglutamináz aktivitását 44%-kal csökkentette, mely arra utal, hogy a transzglutamináz aktivitás gátlása csak részben járul hozzá a Ca^{2+} indukálta aktiváció és az FXIIIa aktivitás együttes gátlásához. Ezen eredmények és az ajánlott klasszifikációs séma alapján a neutralizáló FXIII-A ellenes autoantitest kombinált típusú (IV. típus).

A beteg a megfigyelt időszak alatt tranexámsavat és kortikoidokat kapott. Ez idő alatt két alkalommal volt súlyos vérzéses komplikációja. Az első a jobb rekeszizom szárban megjelenő nagyméretű hematoma volt, melyet később bal rekeszizom szár hematoma és rectus abdominis izom hematoma követett. Fibrogammin® adásával nem tudták megállítani a vérzést, az FXIII aktivitás csak kis mértékben és csak átmenetileg emelkedett meg. A vérzéseket végül intervenciós radiológiai technikával történő embolizációval sikerült elállítani.

Az első vérzéses epizódot követően eradikációs terápia indult Rituximab és immunglobulin, később pedig ciklofoszfamid vagy bortezomid adásával. Az eradikáció jelentősen csökkentette az inhibitor titert, de az teljesen soha nem eliminálódott; a legalacsonyabb titerek 0,9-4,0 BU voltak és az FXIII aktivitás értékek is a detektálhatósági határ alatt maradtak. 4 hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg váratlanul mélyvénás trombózist kapott, mely pulmonáris embóliával társult.

A vena cava inferiorba az antikoaguláns kezelés ellenjavallata miatt szűrőt helyeztek be. A folyamat kedvezően alakult, jó rekanalizációval.

4.3. Fibrinogén- és XIII faktor szintek hemodiafiltrációs és hemodialízis kezelésben részesülő ESRD betegeken

A HDF kezelésben részesülő betegek 56,6%-ában a fibrinogén koncentrációk a referencia tartomány (1,5-4,0 g/l) fölé estek. Az átlagos fibrinogén koncentráció $4,21 \pm 0,82$ g/l-nek adódott. A HDF-ről HD kezelésre történő modalitás váltás nem befolyásolta szignifikánsan a fibrinogén koncentrációt. A HD kezelésben részesülő betegek 50%-ában az továbbra is a referencia tartomány fölé esett $4,23 \pm 0,87$ g/l átlagértékkel. Megjegyzendő, hogy a referencia tartományon belüli fibrinogén értékek túlnyomó része is a referencia tartomány felső részébe esett.

. Mivel a fibrinogén egy akut fázis fehérje és köztudott, hogy az ESRD betegek gyakran szenvednek valamilyen gyulladásos kórképben így annak kizárására, hogy az emelkedett fibrinogén értékek hátterében nem valamilyen gyulladásos folyamat áll, a betegek mintáiból CRP meghatározást is végeztünk, mely értékeket korreláltattuk a fibrinogén koncentrációkkal.

A HDF kezelt betegek 56,6%-ában a CRP koncentráció a referencia tartomány (nők esetén: 4,6 mg/L, férfiak esetén: 5,2 mg/L) fölött volt. Az ESRD betegek CRP koncentrációjának mediánja 5,95 mg/L-nek adódott (interkvartilis tartomány (IQR-Interquartile range): 4,02-15,15 mg/L). Négy, HDF kezelésben részesülő beteg CRP értéke 50 mg/L fölötti volt, melynek hátterében akut gyulladás állt.

Annak ellenére, hogy a két hétig tartó HD kezelés alatt a CRP szintek individuális változásokat mutattak, általánosságban elmondható, hogy ezek a változások nem voltak szignifikánsak. A betegek 53%-ában az értékek továbbra is a referencia tartomány fölött maradtak (medián: 4,75 mg/L, IQR: 2,52-14,33 mg/L).

A látható magas determinációs koeficiensek (r^2 : 0,647, ill. 0,671 HDF és HD kezelésben részesülő betegek esetén), jól demonstrálják a szignifikáns korrelációt ($p < 0,001$) a gyulladásos folyamatok és a fibrinogén szintek között. Sem a HDF-kezelés időtartama (r^2 : 0,018, $p = 0,590$), sem a betegek életkora (r^2 : 0,035, $p = 0,267$) nem

mutatott szignifikáns korrelációt a fibrinogén szintekkel. Továbbá nem volt szignifikáns különbség a nemek között a dialízis kezelés előtti fibrinogén és CRP koncentrációkban.

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy a normál hemosztázis fenntartásához nélkülözhetetlen és a trombotikus betegségek patomechanizmusában szerepet játszó FXIII koncentrációja változik-e ESRD-ben.

Az FXIII szinteket mind funkcionális teszttel, mind antigén meghatározással is mértük. Hasonló eredményeket figyeltünk meg mindkét mérési módszerrel, mind a HDF mind a HD kezelések során, melyet jól mutatnak a determinációs koeficiens értékei. A HDF csoportban (r^2 : 0,876, $p < 0,001$) a HD csoportban (r^2 : 0,916, $p < 0,001$).

A HDF csoportban az átlagos FXIII aktivitás $127,1 \pm 27,3$ %, az átlagos antigén koncentráció pedig $25,9 \pm 5,6$ mg/l-nek adódott. A két hétig tartó hemodialízis kezelés alatt nem történt szignifikáns változás az FXIII értékekben (FXIII aktivitás: $134,0 \pm 29,8$ %, FXIII antigén: $27,1 \pm 6,7$ mg/L-nek adódott). Az átlagok minden esetben a referencia intervallum felső harmadába estek.

A HDF csoportban az egyéni FXIII aktivitás értékek 27 %-a és az FXIII antigén értékek 33%-a meghaladta a referencia tartomány felső értékét. A HD csoportban az aktivitás értékek 43%-a, az antigén értékeknek pedig a 40%-a esett a referencia tartomány fölé. A kapott eredmények azt mutatják, hogy az ESRD betegben az egészséges egyénekhez viszonyítva emelkedett FXIII koncentrációk figyelhetők meg.

Mind az FXIII aktivitás (r^2 : 0,132, $p = 0,061$), mind az antigén (r^2 : 0,147, $p = 0,070$) gyenge, nem szignifikáns korrelációt mutatott a betegek korával. A HDF-kezelés hossza nem korrelált az FXIII-szintekkel (r^2 : 0,004, $p = 0,769$ az FXIII-aktivitás esetében és r^2 : 0,003, $p = 0,272$ az FXIII-antigén esetében). Sem a fibrinogén-, sem a CRP-koncentráció nem befolyásolta szignifikánsan az FXIII-aktivitást vagy az antigénszintet a HDF-kezelt betegeknél (r^2 : 0,001 és $< 0,001$ a fibrinogén esetében, r^2 : 0,007 és 0,004 a CRP esetében). Nem volt nem-specifikus különbség a HDF- vagy HD-kezelt betegek FXIII-aktivitásában/koncentrációjában.

A fenti eredményekből megtudtuk, hogy a HDF és HD kezelések hogyan befolyásolják a fibrinogén és FXIII szinteket hosszútávon, azonban további érdekes kérdés maradt, hogy ezen paraméterek hogyan változnak a négy órán keresztül tartó HDF és HD kezelések alatt. Mivel mind a plazmavíz mind a plazma fehérjék szintje jelentősen

változik a dialízis kezelések során, így a torzítás elkerülése végett az egyes mintákhoz tartozó albumin értékekkel elvégeztük az adatok korrigálását.

Ahogy az várható volt az albumin koncentráció fokozatosan emelkedett a 4 órás HDF és HD kezelések során. A HDF kezelésben részesülő betegek dialízis előtt mért albumin koncentrációja (median: 37 g/l, IQR: 35-40 g/l) szignifikánsan megemelkedett a 4 órás HDF kezelés következtében (median: 42 g/l, IQR: 38-44 g/l, $p < 0,001$). A HD csoportban hasonló emelkedés volt megfigyelhető (median albumin koncentráció a dialízis előtt: 39 g/l IQR: 36-41 g/l, a dialízis után 44 g/l, IQR: 40-48 g/l, $p < 0,001$).

Hasonlóan, a plazma fibrinogén koncentrációja is szignifikánsan megemelkedett a 4 órás kezelések alatt. Az albuminra történő korrigálást követően a dialízis előtt és a 4 órás kezelés után mért fibrinogén értékek közötti különbségek eltűntek, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a fibrinogén koncentrációk kezelése során bekövetkezett emelkedése a plazma bekonzentrálásának volt az eredménye.

Az FXIII értékek estében más volt a helyzet. Az albuminra nem korrigált FXIII aktivitás értékek jelentős emelkedést mutattak mind a HDF mind a HD kezelések hatására, azonban a statisztikailag szignifikáns emelkedés a korrigálást követően továbbra is megmaradt. Az FXIII antigén értékek változása hasonló volt, mint az FXIII aktivitás értékéé.

5. Megbeszélés

Összefoglalva a FXIII-B glikoproteinnel végzett kísérleteinket, elmondhatjuk, hogy sikerült a FXIII N-glikán profiljának teljeskörű karakterizálása, továbbá kifejlesztettünk egy olyan protokollt, mely lehetővé tette a fehérje PNGase F enzimmel történő teljes deglikozilációját. Az ilyen módon deglikozilált fehérje további biokémiai kísérletekben használható, melyek segítenek megérteni a FXIII-B N-glikozilációjának biológiai jelentőségét.

Csak egyetlen olyan közleményről van tudomásunk, melyben megkísérelték a FXIII-B deglikozilációját, azonban ebben az esetben sem a deglikoziláció mértékét, sem a felszabaduló szénhidrát komponensek összetételét, sem a deglikoziláció sikerességét nem vizsgálták. A natív FXIII-B teljes deglikozilációja, ahogyan ebben a tanulmányban

leírtuk, lehetőséget kínál a fehérjéhez kapcsolódó N-glikánok funkcionális és strukturális szerepének feltárására.

Mi vizsgáltuk először, hogy a deglikoziláció befolyásolja-e a FXIII-B dimer szerkezetét. A FXIII-B dimerek kialakulásáért felelős szakaszok a 4. és a 9. sushi doméneken találhatók és figyelembe véve a glikán struktúrák közelségét ezekhez a helyekhez, az egyik feltevésünk az volt, hogy befolyásolhatják a FXIII-B dimerizációját. A deglikozilált FXIII-B molekulasúlya, valamivel kevesebb volt, mint a natív formáé, ez annak a következménye, hogy a szénhidrát komponenseket eltávolítottuk a fehérjéről. Azonban a deglikozilált és a natív FXIII-B meghatározott molekulatömegének közeli értéke azt mutatja, hogy a dimer struktúra a deglikozilációt követően is megmarad.

A deglikoziláció hatását a FXIII-B keringésben eltöltött élettartamára nézve FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk. A fajok közötti különbség, azaz a humán FXIII-B egerekbe történő injektálása nagy valószínűséggel befolyásolta és fel is gyorsította az elimináció sebességét. Nincs elérhető adat a szabad, humán FXIII-B plazmában eltöltött félélet idejére vonatkozóan. FXIII-A hiányos betegekben, a FXIII-A₂B₂ komplex-, valamint a rekombináns FXIII-A₂ (amely a keringésben összekapcsolódik e betegek FXIII-B alegységével) félélet ideje 6,2 és 16 nap között változott. Azonban a komplexben lévő FXIII-B₂ félélet ideje jelentősen eltérhet a nem komplexben lévő fehérje keringésben eltöltött idejétől. A natív humán FXIII-B₂ eliminációs sebessége a FXIII-B KO-egerekben gyorsabb volt a vártnál, amely betudható annak, hogy a beadott fehérjék nem azonos fajból származtak. Azonban az erőteljes különbség a natív és a deglikozilált FXIII-B₂ eliminációs sebessége között azt sugallja, hogy a glikán struktúra meghosszabbítja a FXIII-B₂ élettartamát a keringésben.

PhD értekezésem további célja volt egy FXIII-A ellenes autoantitest okozta, szerzett FXIII hiányban szenvedő beteg kórtörténetének és korrekt diagnózisának részletes ismertetése, mellyel gyarapítani tudjuk a FXIII ellenes antitestek patológiás jelentőségét leíró irodalmat.

Az öröklött FXIII-A hiányban szenvedő betegek súlyos, vérzéses tünetei jól jelzik a FXIII normál hemosztázis fenntartásában való fontosságát. Az általános populációban a FXIII-A hiány az egyik legritkább öröklött véralvadási zavar (egy a kétmillióhoz). A

FXIII ellenes autoantitestek okozta vérzéses hajlam szintén egy ritka állapot, egy 2018-as átfogó tanulmányban 48 már korábban közölt, jól definiált esetet foglaltak össze, 47 betegnél FXIII-A ellenes, 1 betegnél FXIII-B ellenes autoantitesteket azonosítottak. Az autoantitestek megjelenése összefüggésben lehet autoimmun kórképekkel, azonban különösen idős betegeknél gyakori az idiopátiás előfordulás. A képződött autoantitest zavarhatja a FXIII aktivációját, gátolhatja a FXIIIa TG aktivitását, és immunkomplexet képezve a fehérjével, felgyorsíthatja annak kiürülését a keringésből.

A trombotikus komplikációk ritkaságnak számítanak a FXIII ellenes autoantitesttel rendelkező betegeknél, csupán néhány esetet írtak le és egy részüket hatalmas hematóma miatti vénakompresszióknak tulajdonították. A mi esetünkhöz hasonlóan két további olyan esetet írtak le, melyben a betegeknél pulmonáris embólia alakult ki.

A FXIII-A ellenes autoantitestek következtében kialakuló, szerzett FXIII hiány diagnózisa és klinikai kezelése meglehetősen nagy kihívást jelent. Az általunk bemutatott eset jól demonstrálja, hogy a váratlan eltérések a laboratóriumi eredmények értékelésben jelentősen megnehezíthetik a korrekt diagnózis felállítását és az előre nem látható klinikai történések bonyolíthatják a klinikai lefolyást.

Az általunk leírt eset kapcsán az alábbi következtetések vonhatóak le:

1. a FXIII aktivitás vak korrekció nélkül történő meghatározása jelentősen félrevezethet a faktor hiány súlyosságának megítélésében.
2. a betegben jelenlévő FXIII-A ellenes autoantitest interferálhat az immunoassay során használt antitesttel, ezáltal a FXIII-A₂ és FXIII-A₂B₂ antigén szintek nagyfokú alámérését eredményezheti.
3. a Nijmegen-Bethesda assay mellett, az IC₅₀ és a disszociációs konstans meghatározása szintén hasznos az autoantitest megfelelő karakterizálása céljából.
4. a megfelelő klasszifikációhoz szükséges azonosítani a mechanizmust, amely alapján az autoantitest interferál a FXIII aktivációjával/aktivitásával.
5. a gátló hatású FXIII-A ellenes autoantitest nem védi meg a beteget a tromboembóliás szövődményektől.

ESRD betegeknél a trombotikus és a vérzéses kórképek kialakulásának kockázata egyaránt jelentős. A véralvadási rendszerben bekövetkező változások hozzájárulhatnak ezen elváltozások patogeneziséhez. Ezért az alvadási és fibrinolitikus faktorok vizsgálata

segíthet felfedni az okokat, melyek ezen paradox helyzet hátterében állnak. Érdekes kérdés, hogy az emelkedett FXIII szint az ESRD betegekben hozzájárul-e az aterotrombotikus vagy tromboembóliás kórképekhez. Ezt a feltevést már néhány tanulmányban vizsgálták, de ezek alapján általános következtetést nem lehetett levonni.

A hemodialízisben részesülő ESRD betegeken végzett tanulmányunk során kettős célt tűztünk ki. Egyrészt, hogy megvizsgáljuk a hemodialízis kezelés hosszútávú hatását a véralvadás utolsó szakaszában kulcsszerepet játszó komponensek aktivitására és koncentrációjára nézve, és e tekintetben összehasonlítani a két hemodialízis kezelést, a HDF-t és HD-t. Másrészt, ezen kezelések rövid távú hatásainak tanulmányozása, azaz az egyéni változások nyomon követése a négyórás dialízis kezelése során.

A fibrinogén, a fibrin prekursor fehérjéje, mely a hemosztázisban betöltött kulcsfontosságú szerepe mellett, a sebgyógyulás folyamatában is jelentős szerepet játszik. Az emelkedett fibrinogén koncentráció az aterotrombotikus megbetegedések, mint a hemorrágiás stroke és az iszkémiás szívbetegség független rizikó faktora. A krónikus HD kezelésben részesülő ESRD betegeken végzett néhány tanulmány, a dialízis kezelés előtt levett vérmintákból mért emelkedett fibrinogén koncentrációról számolt be, habár egy részüknél az emelkedés mértéke nem érte el a statisztikailag szignifikáns értéket. Méréseink során hasonlóan a korábban közölt tanulmányok eredményeihez, emelkedett fibrinogén értékeket kaptunk a dialízis előtt levett mintákból. HDF kezelés esetén a betegek 56,6%, HD kezelés esetében a betegek 50,0%-ában a plazma fibrinogén koncentrációja a referencia tartomány fölé esett. Nem találtunk szignifikáns különbséget a HD és a HDF hatása között. Mindkét kezelési típus esetében a dialízis előtti fibrinogén és CRP szintek szoros összefüggést mutattak és a magas determinációs koeficiensek is arra utaltak, hogy legalább részben az akut fázis fehérjék emelkedett szintézise felelős az emelkedett fibrinogén szintekért. Egyéb vizsgált változók, mint a dialízis kezelés hossza, a kor és a nem, nem befolyásolta a dialízis előtt mért fibrinogén koncentrációt. A kezelés előtti emelkedett értékeket feltehetően a fibrinogén szintézisre gyakorolt hosszabb ideje tartó hatások határozzák meg, egyetlen dialízis kezelés akut hatását nagy valószínűséggel más, gyorsan ható tényezők is befolyásolják. Mind a HDF mind a HD kezelése során a fibrinogén koncentrációk fokozatos emelkedését figyeltük meg. Azt feltételeztük, hogy ezek az emelkedő értékek a betegek plazmájának dialízis kezelés alatti bekonzentrálódásának voltak tulajdoníthatók, ezt a feltevésünket alátámasztotta, hogy az

egyes minták albumin értékeivel történő korrigálását követően a fibrinogén szintek már nem mutattak fokozatos emelkedést a kezelések során.

A hemodialízis kezelés ESRD betegek FXIII szintjére kifejtett hatását csupán néhány tanulmányban vizsgálták. Kolb és munkatársai normál FXIII aktivitás és FXIII-A antigén szinteket mértek dialízis kezelés előtt levett mintákból, további két tanulmányban azonban szignifikánsan emelkedett FXIII-A koncentrációkról számoltak be.

Esetünkben a FXIII aktivitást és a FXIII-A₂B₂ komplex koncentrációját párhuzamosan határoztuk meg. A HDF csoportban az egyéni FXIII aktivitás értékek 27%-a és a FXIII antigén értékek 33%-a meghaladta a referencia tartomány felső értékét. A HD csoportban az aktivitás értékek 43%-a, az antigén értékeknek pedig a 40%-a esett a referencia tartomány fölé. A kapott eredmények azt mutatják, hogy az ESRD betegek egy jelentős részében az egészséges egyénekhez viszonyítva emelkedett FXIII koncentrációk figyelhetők meg. A 4 órás HDF és HD kezelések alatt a FXIII aktivitás szignifikáns emelkedést mutatott. A fibrinogén szintekkel ellentétben az albumin koncentrációval történő korrekciót követően a FXIII értékek továbbra is emelkedettek maradtak, habár a szignifikancia szintje valamelyest csökkent. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a kezelések alatt a betegek plazmájának bekonzentrálódása nem magyarázza az emelkedett FXIII szinteket és további vizsgálatok szükségesek annak érdekében, hogy feltárjuk azt a mechanizmust, amely a FXIII szintek emelkedéséhez vezet ESRD betegekben a hemodialízis kezelés során.

6. Összefoglalás

Az FXIII véralvadási faktor védő/stabilizáló funkciót ellátó B-alegysége egy 80 kDa molekulású glikoprotein, mely két N-glikozilációs helyet tartalmaz. A glikánok FXIII-B szerkezetében és funkciójában betöltött szerepét ezidáig még nem vizsgálták. Ezért célunk volt az FXIII-B-hez kapcsolódó glikánok felszabadítása, majd ezt követően a pontos szerkezetük azonosítása, valamint egy olyan módszer kidolgozása, mely lehetővé teszi a fehérje natív körülmények között történő deglikozilációját, hogy megvizsgáljuk milyen hatása van a glikánoknak az FXIII-B dimer szerkezetére, valamint keringésben eltöltött félélet idejére nézve. Az aszparaginhoz kapcsolódó szénhidrátokat a humán FXIII-B-ről PNGase F enzimmel vágtuk le. A felszabadult N-oligoszacharidokat fluoroforral jelöltük és kapilláris elektroforézissel vizsgáltuk. A glikánok pontos szerkezetének azonosításához exoglikozidáz alapú szekvenálást és adatbázist használtunk. A deglikozilált FXIII-B szerkezetét gélfiltrációval vizsgáltuk. A deglikozilált és natív FXIII-B plazmából történő kiürülését FXIII-B knock-out egerekben vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. A PNGase F emésztés teljesen eltávolította az N-glikánokat a denaturált fehérjéről. A natív fehérje deglikozilációját emelt koncentrációjú ismételt PNGase F emésztéssel értük el. Az FXIII-B alegységen 9 cukorstruktúrát azonosítottunk, melyből 3 fukozilált volt és mindegyik struktúra legalább 1 szíálsavat tartalmazott. A deglikoziláció nem változtatta meg az FXIII-B natív dimer szerkezetét, de felgyorsította kiürülését a FXIII-B knock out egerek keringéséből. Mi írtuk le először az FXIII-B-n jelenlévő N-glikánok szerkezetének részletes jellemzését. Sikeresen végrehajtottuk a natív fehérje teljes deglikozilációját. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy kapcsolódó glikánok nem szükségesek az FXIII-B dimer képződéséhez, de nagy valószínűséggel meghosszabbítja az FXIII-B felezési idejét a keringésben.

Az FXIII ellenes autoantitestek okozta vérzési hajlam egy ritka de súlyos rendellenesség. A diagnózis és kezelés kihívásait jól mutatja a 67 éves női betegünk esete, akinek a kórelőzményeiben vérzéses komplikációt nem írtak le, azonban váratlanul egy hatalmas muszkuláris hematomája alakult ki. Vak korrekció nélkül az FXIII aktivitást 17%-nak mértük, azonban a vakkal történő korrekciót követően a beteg FXIII aktivitás

értéke a detektálhatósági határ alatt volt, ezt az eredményt szintén alátámasztotta, hogy a beteg plazmájában a fibrinszálak közötti keresztkötések nem alakultak ki. Az FXIII-A-t ELISA technikával nem tudtuk detektálni, azonban Western blot technikával szemmel látható volt az FXIII-A jelenléte. A betegben jelenlévő autoantitestek nagy affinitással kötődtek az FXIII-A₂-höz. Az inhibitor jelentős gátló hatását jól mutatja a magas inhibitor titer, melyet Bethesda egységben adtunk meg, valamint az, hogy a betegből származó IgG már alacsony koncentrációban is nagymértékű gátlást fejtett ki. Fő biokémiai hatását a Ca²⁺ által kiváltott aktiváció gátlásán keresztül fejtette ki. A betegnél alkalmazott eradikációs terápia sajnos csak részben volt sikeres. Négy hónappal az utolsó vérzéses komplikációt követően a beteg pulmonáris embóliával komplikált mélyvénás trombózist kapott.

A végstádiumú vesebetegségben szenvedők esetében a hemosztázis zavara gyakori, mely vérzéses és trombotikus szövődményként egyaránt megnyilvánulhat. Az alvadási és fibrinolitikus faktorok vizsgálata segíthet felfedni az okokat, melyek ezen paradox helyzet hátterében állnak. Ennek érdekében a fibrin képződéshez és stabilizációjához nélkülözhetetlen komponenseket vizsgáltunk HDF- és HD kezelésben részesülő ESRD betegekben. Dialízis előtti fibrinogén, FXIII antigén koncentráció és FXIII aktivitás emelkedett értékeket mutatott. A betegekben zajló gyulladásos állapotok, melyet a CRP koncentrációk mérésével jellemeztünk kulcsfontosságú volt a fibrinogén koncentrációk esetén. A négy órán keresztül tartó HDF és HD kezelések alatt a fibrinogén koncentrációk és az FXIII szintek fokozatos emelkedést mutattak. Azonban az albuminra történő korrekciót követően már csak az FXIII szintek mutattak jelentős emelkedést a kezelések előrehaladtával. A két kezelési típus között nem találtunk szignifikáns különbséget. Ennek alapján elmondható, hogy ez ESRD betegekben megfigyelt emelkedett fibrinogén és FXIII szintek hozzájárulhatnak a fokozott trombózis rizikóhoz.



Nyilvántartási szám: DEENK/181/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hurják Boglárka
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bovet, J., **Hurják, B.**, Maistre, E. D., Katona, É., Péntes-Daku, K., Muszbek, L.: Autoimmune Factor XIII Deficiency With Unusual Laboratory and Clinical Phenotype.
J. Thromb. Haemost. 18 (6), 1330-1334, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14811>
IF: 5.824
2. **Hurják, B.**, Kovács, Z., Dönczö, B., Katona, É., Haramura, G., Erdélyi, F., Shemirani, A. H., Sadeghi, F., Muszbek, L., Guttman, A.: N-glycosylation of blood coagulation factor XIII subunit B and its functional consequence.
J. Thromb. Haemost. 18 (6), 1302-1309, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14792>
IF: 5.824
3. Péntes-Daku, K., **Hurják, B.**, Katona, É., Becs, G., Balla, J., Muszbek, L.: Terminal Phase Components of the Clotting Cascade in Patients with End-Stage Renal Disease Undergoing Hemodiafiltration or Hemodialysis Treatment.
Int. J. Mol. Sci. 21, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228426>
IF: 5.924

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,572

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 17,572

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.05.30.

